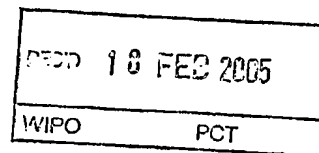




KONGERIKET NORGE  
The Kingdom of Norway



Bekreftelse på patentsøknad nr  
*Certification of patent application no*

▽  
**20044581**

▷ Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 2004.10.25

▷ It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 2004.10.25

Priority is claimed from patent application no 20040128 filed on 2004.01.12

2005.02.05

*Line Reum*

Line Reum  
Saksbehandler

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



# Søknad om patent

www.patentstyret.no



Ferdig utfylt skjema sendes til adressen nedenfor. Vennligst ikke heft sammen sidene.  
Vi ber om at blankettene utfylles *maskinelt* eller ved bruk av *blokkbokstaver*. Skjema for utfylling på datamaskin kan lastes ned fra **www.patentstyret.no**.

2004 -10- 25

## Søker: Den som søker om patent blir også innehaver av en eventuell rettighet. Må fylles ut!

Forretakets navn (fornavn hvis søker er person):

Geir

Etternavn (hvis søker er person):

Hetland

☐ Kryss av hvis søker tidligere har vært kunde hos Patentstyret.

Oppgi gjerne kundennummer:

Adresse:

Nadderudveien 138A

Postnummer:

1353

Poststed:

Eiksmarka

Land:

Norge

☐ Kryss av hvis flere søkere er angitt i medfølgende skjema eller på eget ark.

☒ Kryss av hvis søker(ne) utfører 20 årsverk eller mindre (se veiledning).

## Kontaktinfo: Hvem skal Patentstyret henvende seg til? Oppgi telefonnummer og eventuell referanse.

Fornavn til kontaktperson for fullmektig eller søker:

Trond

Etternavn:

Gustad



Telefon:

21 00 90 00

Referanse (maks. 30 tegn):

O: 159272 TG/kmg

SØKNAD S. 1 av 2

FLERE SØKERE

FLERE OPPFINNERE

PRIORITERET

VEILEDNING

## Fullmektig: Hvis du ikke har oppnevnt en fullmektig, kan du gå til neste punkt.

Forretakets navn (fornavn hvis fullmektig er person):

Oslo Patentkontor AS

Etternavn (hvis fullmektig er person):

☒ Kryss av hvis fullmektig tidligere har vært kunde hos Patentstyret.

Oppgi gjerne kundennummer:

1077

Adresse:

Postboks 7007M

Postnummer:

0306

Poststed:

OSLO

Land:

Norge

## Oppfinner: Oppfinneren skal alltid oppgis, selv om oppfinner og søker er samme person.

Oppfinnerens fornavn:

Geir

Etternavn:

Hetland

☐ Kryss av hvis oppfinner tidligere har vært kunde hos Patentstyret.

Oppgi gjerne kundennummer:

Adresse:

Nadderudveien 138A

Postnummer:

1353

Poststed:

Eiksmarka

Land:

Norge

☐ Kryss av hvis flere oppfinnere er angitt i medfølgende skjema eller på eget ark.

### ADRESSE

► Postboks 8160 Dep.  
Københavnsgaten 10  
0033 Oslo

### TELEFON

► 22 38 73 00  
TELEFAKS  
► 22 38 73 01

### BANKGIRO

► 8276.01.00192  
ORGANISASJONSNR.  
► 971526157 MVA



**PATENTSTYRET®**  
Styret for det industrielle rettsvern



**Tittel** (Gitt en kort, benevnelse eller tittel for oppfinnelsen (ikke over 256 tegn inkludert mellomrom))

**Tittel:**  
"Anvendelse av soppen Agaricus blazei Murill ved fremstilling av medikamenter til bekjempelse av infeksjoner og allergier"

**PCT** (Fylls bare ut hvis denne søknaden er en videreføring av en tidligere innlevert internasjonal søknad (PCT))

PCT-søknadens dato og nummer:

PCT /

**Prioritetskrav** (Hvis du ikke har søkt om denne oppfinnelsen tidligere i et annet land eller i Norge, kan du gå videre til neste punkt)

**Prioritet kreves på grunnlag av tidligere innlevert søknad i Norge eller utlandet:**

Opplysninger om tidligere søknad. Ved flere krav skal tidligste prioritet angis her:

Inngivelsesdato (åååå.mm.dd):

2004.01.12

Landkodo:

NO

Søknadsnummer:

20040128

☐ Flere prioritetskrav er angitt i medfølgende skjema, eller på eget ark.

**Biologisk materiale** (Fylls bare ut hvis oppfinnelsen omfatter biologisk materiale)

**Søknaden omfatter biologisk materiale. Deponeringssted og nummer må oppgis:**

Deponeringssted og nummer (bortsett gjenn. eget ark):

☐ Prøve av materiale skal bare utleveres til en særlig sakkyndig.

**Avdekt/utskilt** (Hvis du ikke har søkt om patent i Norge tidligere, kan du gå videre til neste punkt)

**Søknaden er avdekt eller utskilt fra tidligere levert søknad i Norge:**

☐ Avdekt søknad

Informasjon om opprinnelig

Dato (åååå.mm.dd):

Søknadsnummer:

☐ Utskilt søknad

søknad/innsendt tilleggsmateriale

**Annet**

☐ Søknaden er også levert per telefaks.

Oppgi dato (åååå.mm.dd):

☐ Jeg har fått utført forundersøkelse.

Oppgi nr (årstall - nummer - bokstav):

**Vedlegg** (Angi hvilken dokumentasjon av oppfinnelsen du legger ved, samt andre vedlegg)

☒ Tegninger

Oppgi antall tegninger:

9

☒ Beskrivelse av oppfinnelsen

☒ Patentkrav

☐ Fullmaktsdokument(er)

☒ Sammendrag på norsk

☐ Overdragelsesdokument(er)

☐ Dokumentasjon av eventuelle prioritetskrav (prioritetsbevis)

☐ Erklæring om retten til oppfinnelsen

☐ Oversettelse av internasjonal søknad (kun hvis PCT-felt over er fylt ut)

☒ Annet: Brev til Styret (ber om rask behandling)

**Dato/underskrift** (Søknaden må være utpunktet under Saker i Oppfinners og Avdekkings Saker, søknaden må være utpunktet under Saker i Oppfinners og Avdekkings Saker)

Sted og dato (blokkbokstaver):

Oslo, 25. oktober 2004

Navn i blokkbokstaver:

Oslo Patentkontor AS

NBI Søknadsavgiften vil bli fakturert for alle søknader (dvs. at søknadsavgiften ikke skal følge søknaden).  
Betalingsfrist er ca. 1 måned, se faktura.

Signatur:

*Knut R. Rindem*

OSLO PATENTKONTOR AS  
Postboks 114, 0403 OSLO



**PATENTSTYRET®**  
Styret for det industrielle rettsvern

25. oktober 2004  
O: 159272 - TG/KMG  
Soppen Agaricus blazei Murill 2

Norsk patentsøknad nr.

**SØKER:**

Geir Hetland  
Nadderudveien 138A  
1353 Eiksmarka  
Norge

**Oppfinnere:**

Geir Hetland  
Nadderudveien 138A  
1353 Eiksmarka  
Norge

**Tittel:**

Anvendelse av soppen Agaricus blazei Murill ved  
fremstilling av medikamenter til bekjempelse av  
infeksjoner og allergier

**Fullmektig:** Oslo Patentkontor AS, Boks 7007M, N-0306 Oslo

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av soppen *Agaricus blazei murill* (AbM) ved fremstilling av et medikament til bekjempelse eller forebygning av bakterielle og ikke-bakterielle infeksjoner (for eksempel parasitter eller virus) i pattedyr samt til bekjempelse forebygning av allergi hos pattedyr. Eksempelvis kan en slik infeksjon være forårsaket av pneumokokker og enda mer spesielt hvor pattedyret er et menneske.

### Innledning

- 10    Bruk av medisinske sopper har vært en del av tradisjonell asiatisk kultur i mer enn 3000 år.

Mange substanser fra sopper er vist å påvirke immunsystemet og kunne brukes til behandling av en rekke sykdommer (Wasser et al. 1999). I Japan er det gjort mye forskning på helseeffekter av sopper (Ikekawa 2001). *Agaricus blazei Murill* (AbM) fra familien *Basidiomycetes* er en slik medisinsk sopp som er meget populær i Japan og dyrkes kunstig (Chen 2000) for helsekostmarkedet. Denne soppen vokser naturlig nær en liten brasiliansk landsby, Pietade, utenfor São Paulo hvor det daglig er store klimatiske endringer. I dette området ble AbM brukt i maten og lokalbefolkningen syntes å ha lav forekomst av kreft og andre helseproblemer (Huang 1997). I 1965 sendte dr. Takatoshi Furumoto AbM sporer til Japan og forskere ved The National Cancer Center Research Institute of Japan og støttet av The Japanese Pharmacological Society publiserte etter hvert resultater som viste at AbM hadde kreftbekjempende egenskaper. AbM er rik på immunstimulerende og kreftmotvirkende sukkermolekyler (polysakkarider) som beta (1,3) og (1,6) glukaner (Kawagishi et al. 1989; Iwade & Mizuno, 1997; Huang 1997; Stamets 2000, Ohno et al. 2001; Sorimachu et al. 2001).

Ekstrakter av den spiselige soppen *Agaricus blazei Murill* (AbM) har blitt brukt de siste 10-20 år i Japan som

helsekost mot en rekke sykdommer som kreft, sukkersyke, åreforkalking og kronisk leverbetennelse.

Alle disse sykdommer er imidlertid grunnet svekkelse/abnormaliteter i celler hos den angrepne person, og har ikke  
5 sitt opphav i angrep fra ytre organismer så som bakterier.

Den krefthemmende effekten av AbM-komponenter er vitenskapelig dokumentert i musemodeller og på kreftceller (Itoh et al., 1994; Fujimiya et al. 1998; Ebina & Fijimiya, 1998; Takaku et al. 2001; Menoli et al. 2001; Bellini et al.  
10 2003). AbM mycelium er også påvist å hemme ødeleggende effekter (cytopatiske) av WEE (western equine encephalitis) virus på celler i kultur (Sorimachi et al. 2001). NB - denne artikkelen undersøkte ikke evt. effekt av AbM mycelium på virusinfeksjonen som sådan. Ellers er det ikke  
15 tilgjengelig engelsk-språklige rapporter i offentlige databaser som dokumenterer andre helseeffekter av AbM, heller ikke ovenfor infeksjoner.

Matsoppen *Agaricus blazei* Murill (AbM), som vokser naturlig utenfor São Paulo, Brasil, har de siste 10-årene blitt  
20 dyrket kunstig og brukt i helsekost i Japan for å beskytte mot en rekke av de ovenfor nevnte sykdommer, inkludert kreft. Selv om slik anvendelse av denne soppen er kjent, er det ingen selvfølge at soppen også skal virke mot bakterielle infeksjoner. Mange helsekostprodukter er regnet  
25 for å kunne virke kurerende og forebyggende på sykdommer uten at dette har blitt dokumentert. Videre er det ikke umiddelbart innlysende at selv om et produkt er kjent for å forsterke immunsystemet, vil det samme produktet være virksomt mot bakterielle infeksjoner. Heller ikke er det åpen-  
30 bart at effekten av  $\beta$ -glukaner generelt ville tilsi at ekstrakter fra soppen *Agaricus blazei* Murill skulle være virksomt mot bakterielle infeksjoner, og heller ikke at AbM faktisk er mer virksomt enn øvrige naturlige medikamenter på dette område.

Effekten av ekstrakter av AbM mot bakteriell infeksjon i mus er i henhold til foreliggende opprinnelse undersøkt i en modell hvor musene utsettes for dødelig infeksjon med pneumokokker (*Streptococcus pneumonia* serotype 6B). AbM-  
5 ekstrakt ble gitt via mavesonde til musene fra 24 timer til umiddelbart før innsprøyting av pneumokokker i bukhulen. Det ble tatt blodprøver daglig til bakteriedyrkning fra en lårvene på musene og overlevelsesraten av musene ble notert. Det ble funnet at en dose AbM-ekstrakt gitt med  
10 mavesonde, enten 24, 2 eller 0 timer før bakteriesmitte, reduserte bakterietallet i blod og øket overlevelsen av dyrene i forhold til dyr som fikk saltvann via mavesonde. Hele 50% av dyrene som fikk et AbM ekstrakt 24 timer før smitte overlevde dag 10 mot 13% av kontrolldyrene dag 7.  
15 Dette viser at ekstrakt fra AbM kan brukes som beskyttelse mot og evt. behandling av pneumokokkinfeksjon.

I en tid med økende antibiotikaresistens vil AbM kunne være et naturlig alternativ eller supplement til antibiotika og evt. andre anti-infeksjonsmidler, men med færre  
20 bivirkninger og positiv bieffekt som kreftbeskyttende substans.

Pneumokokken, *Streptococcus pneumoniae*, er en gram-positiv diplokokk som forårsaker potensielt dødelige sykdommer som blodforgiftning (sepsis) og hjernehinnebetennelse, men også  
25 mindre alvorlige infeksjoner som lunge-, mellomøre- og bihulebetennelse. Det finnes 90 undergrupper (serotyper) av pneumokokker, deriblant serotype 6B (Henrichsen 1979) som har moderat infeksjonsfremkallende evne (virulens) og derfor gir et forholdsvis langstrakt, men likevel dødelig, sykdomsforløp i forsøksmus (Aaberge et al. 1995). Siden  
30 hyppigheten av antibiotikaresistente bakterier, slik som multiresistent *S. pneumoniae*, er en fare for folkehelsen og antibiotika om få 10-år trolig har ytterligere redusert eller manglende effekt, burde man forsøke å finne gode  
35 alternative forbyggende og behandlende prinsipper.

$\beta$ -glukaner er kjente immunmodulerende substanser (Riggi & DiLuzio, 1961; Bøggwald et al., 1984) og hovedkomponenter i celleveggen i mugg og gjørsopp.  $\beta$ -glukaner har anti-infeksjon (Reynolds et al., 1980; Franek et al., 1992) og anti-  
 5 kreft (Tagucho et al., 1983; Ohno et al., 1987) effekter i dyremodeller. Et 1,3- $\beta$ -glukan i fruktlegemet i AbM kan være soppens anti-kreft prinsipp ) (Ohno et al. 2001).

Det er tidligere funnet at  $\beta$ -glukaner (bla. SSG fra soppen *Sclerotinia sclerotiorum* og fra gjørsopp), samt et sukker-  
 10 molekyl fra groblad, *Plantago major* L., beskytter mot infeksjon med BCG og pneumokokker i musemodeller (Hetland et al., 1998; Hetland et al. 2000a, b, Hetland 2003). Disse effektene ble observert etter injeksjon av substansene i musenes bukhule, men ikke bekreftet etter sondeforing.  
 15 Forsøk viste at den beskyttende effekten skyldtes stimulering av det medfødte immunsystemet hvor makrofagen er en sentral immuncelle. Det er også vist at SSG og MacroGard® fra gjørsopp hemmer oppvekst av tuberkelbakterien, *Mycobacterium tuberculosis* i makrofagcellekulturer (Hetland  
 20 & Sandven, 2002).

Målet med foreliggende oppfinnelse er å anvende et AbM-ekstrakt til fremstilling av et medikament som beskytter mot bakterielle infeksjoner eksemplifisert ved dødelig pneumokokkinfeksjon hos mus med serotypen 6B. Dette ble  
 25 gjort ved å tilføre pneumokokkene ved hjelp av mavesonde til musene. Effekt av AbM-ekstrakt ble vurdert ut fra bakterietall i veneblod og overlevelsesrate av dyrene.

Det er videre et mål for foreliggende oppfinnelse å anvende et ekstrakt fra soppen *Agaricus blazei* Murill til frem-  
 30 stilling av et medikament som bekjemper eller lindrer allergi hos pattedyr, spesielt mennesker.

Allergi er et stadig økende problem i den vestlige verden, deriblant Norge. Ekstrakter fra soppen *Agaricus blazei* Murill (AbM) brukes, som nevnt ovenfor, tradisjonelt i



Japan mot flere sykdommer, blant annet kreft, og effekten av AbM mot en krefttype er dokumentert. AbM inneholder immunstimulerende polysakkarider så som  $\beta$ -glukaner, og disse er tidligere vist å virke immunmodulerende og å gi den  
5 nevnte beskyttelsen.

Som bakgrunn for den overraskende oppdagelsen at ekstrakter fra soppen *Agaricus blazei murill* vil det kort oppsummeres de følgende forhold. Immunsystemet deles inn i det medfødte (som, uten å være bundet av eventuelle teorier, AbM  
10 tilsynelatende påvirker) og det adaptive immunsystem. Dette deles igjen inn i T-hjelper-celle-1, -2 og -3-responser (Th1, Th2 og Th3), hvor Th1-responsen blant annet er viktig for anti-infeksjon- og anti-tumor-forsvaret, Th-2 for anti-parasitt og anti-forkastelses-forsvaret, men  
15 fremmer allergi, og Th-3 gir anti-inflammasjon (betenelsesdemping) og fremmer nydannelse av vev. I tillegg er det nå sterkt fokus på regulatoriske T-hjelper-celler. Ifølge T-hjelper-celle-1 (Th1)/Th2-paradigmet er disse responsene inverst proporsjonale fordi Th1 vil hemme Th2 og  
20 omvendt slik at en høy Th1-respons er forenlig med en lav Th2-respons.

Det er, som nevnt ovenfor, funnet at AbM-ekstrakt er virksomt overfor infeksjoner eksemplifisert ved pneumokokk-infeksjon i en musemodell. Det er imidlertid indikasjoner  
25 som peker mot at det finnes andre substanser i AbM som er vel så viktige som glukaner for den aktuelle anti-infeksjonseffekten som er påvist. Siden anti-infeksjonseffekten skyldes en høy Th1-respons, vil det ut fra den virkning av immunsystemet som er forklart ovenfor, forventes en samtidig  
30 hemmet Th2-respons. Da allergi er resultatet av en høy Th2-respons, har AbM-ekstraktet overraskende også en stimulerende effekt på Th2-responsen, noe som er overraskende og uventet ut fra en forventet lav Th2-respons basert på den beskyttende effekten AbM-ekstraktet har mot  
35 infeksjoner.

For å undersøke effektene AbM har for å hemme utvikling av allergi, ble det gjort forsøk med en musemodell som ble immunisert med modellallergen ovalbumin (OVA). Nivå av IgE og IgG1 (Th2-allergisk respons) og IgG2a (anti-infeksjons/kreftrespons) anti-OVA-antistoffer ble målt i musenes serum ved avslutning av forsøket. Det ble også undersøkt nivå av signalsubstanser (cytokiner) som utskilles til blod fra stimulerte immunceller, noe som vil indikere den aktuelle (Th1 (INF $\gamma$ , IL-12), Th2 (IL-5, IL-10, IL-13) eller Th3 (TGF $\beta$ ) -respons. Det er tidligere påvist produksjon av de betennelsesfremmende cytokinene (TNF- $\alpha$  og IL-8) og NO $^-$  (toksisk nitrogenforbindelse) fra AbM-stimulerte makrofager (hvite blodceller som er viktige i det medfødte immunforsvaret) (Sorimachi 2001).

De aktuelle forsøk til underbygning av den anti-allergiske effekten av AbM-ekstrakt er gitt under overskriften "Materialer og metoder II, mens de aktuelle forsøk til underbygning av anti-infeksjonseffekten av AbM-ekstrakt er gitt under overskriften "Materialer og metoder I".

## 20 UNDERBYGNING AV ANTI-INFEKSJONSEFFEKTEN AV ABM-EKSTRAKT:

### Materialer og metoder I

Mus. Alle dyreeksperiment ble godkjent av den lokale representant for den nasjonale etiske komité for forsøk med dyr og utført i henhold til nasjonal standard fra Landbruksdepartementet. Det ble brukt innavlede mikrobefrie hunnmus av stammen NIH/OlaHsd fra Harlan Olac Ltd., England. Musene var 6 uker gamle ved ankomst og hvilte 1 uke før eksperimentering.

### Reagenser

30 Ekstrakter A, B, C, D og E fra AbM mycelium var fra forskjellige japanske produsenter av helsekost. Ekstrakt A ("gold label type") var det høyest rensede produktet og

ekstrakt B ("Katsu type") et mindre rensset produkt, begge fra ACE Co., Ltd., Gifu-ken, Japan. Produsentene av AbM-ekstrakt C, D, og E er ikke informert om denne studien og navnene derfor ikke oppgitt. Fosfatbufret saltvann (PBS) ble brukt som kontroll.

*Bakterier.* En stamme av *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B fra RIVM, Netherland, ble brukt. Den ble holdt frosset og benyttet til smitteforsøk som kjent tidligere (Aaberge et al. 1995).

10 *Blodprøvetaking.* Det ble tatt blodprøver fra den utvendige lårvenen på bakbena (*Saphena magna*) til musene. Blodet ble så dyrket som kjent tidligere (Aaberge et al. 1995).

*Kvantifisering av koloni-formende enheter (CFU) i blod.* Venøst blod (25 µl) ble fortynnet 10-folds i Todd-Hewitt agar, og 25 µl av fortynnet blod ble sådd ut på blodagar-plater, som ble inkubert ved 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Etter 18 timer ble koloniene telt.

*Eksperimentell prosedyre.* To eksperimenter ble utført med 7-9 dyr i hver behandlingsgruppe (Tabell 1, Figurlegende). Volumet av PBS eller AbM ekstrakt til sondeforing var 200 µl. Alle dyr ble blødd på tidspunkter angitt i figurene og blodet ble sådd ut på agarplater. Dyrene ble inspisert daglig og svært syke mus ble avlivet ved nakkestrekk.

20 *Målinger.* Dette var bakterieinnhold i perifert blod bestemt vha. *S. pneumoniae* CFU telling, og dyrenes overlevelseshastighet.

30 *Statistikk.* Parametriske tester ble brukt på normalfordelte data, ellers non-parametriske tester. En-veis repeterte målingers ANOVA/ Tukey's test ble brukt for multiple sammenlikninger, og paret t-test for enkle sammenlikninger. P verdier under 0,05 ble ansett å være statistisk signifikante.

## Resultat

*Effekt av AbM ekstrakt gitt 2 timer før smitte, på S. pneumoniae serotype 6B infeksjon*

Mus ble gitt PBS eller et av 5 AbM-ekstrakt (A-E) fra forskjellige produsenter via mavesonde 2 t før bukhuleinjeksjon (i.p.) av *S. pneumoniae* serotype 6B. Blodprøver til bakteriedyrkning ble tatt daglig fra lårvenen og sykkeligheten til dyrene overvåket. Kun AbM ekstrakt A ga signifikant lavere CFU nivå sammenliknet med PBS kontrollen (p<0.05) (Fig. 1). Overlevelsesraten til mus gitt AbM-ekstrakt A var også høyere enn til mus gitt PBS (p<0.05) (Fig. 2). Selv om ingen kontrolldyr overlevde dag 5 etter smitte, var 38% av dyrene i gruppe A i live etter 6 dager. Blant disse levde fortsatt 25% på dag 7, men måtte avlives pga. nevrologiske komplikasjoner. AbM ekstrakt D viste en tendens til lavere bakterietall i blod og øket overlevelse, men forskjellene var ikke statistisk signifikante i forhold til PBS (Fig. 1, 2).

*Effekt av AbM-ekstrakt gitt 24 timer før eller med smitte, på S. pneumoniae 6B- infeksjon*

I neste eksperiment ble AbM-ekstrakt A eller PBS gitt enten 24 timer, 2 timer eller umiddelbart før smitte. Selv om funnet ovenfor med AbM-ekstrakt A gitt 2 timer før smitte, ikke var statistisk signifikant, viste eksperiment 2 den samme tendens (Fig. 3, 4). Den forebyggende positive effekten til AbM-ekstrakt A ble statistisk konfirmert når ekstraktet ble gitt 24 timer før smitte, både mht. bakterietall i blod (p<0.05) (Fig. 3) og overlevelsesrate (p<0.05) (Fig. 4). Det var også liknende og signifikante resultater når ekstrakt A ble gitt like før smitte. Faktisk overlevde 38% av dyrene som fikk AbM-ekstrakt A to eller 0 timer før smitte dag 10 i dette forsøket sammenliknet med 10-20% av kontrollene etter dag 7. Best resultat ble oppnådd når ekstrakt A ble gitt 24 timer før smitte da dette

ga en overlevelsesrate etter 10 dager på hele 50% (Fig. 4) i forhold til PBS kontroll etter 7 dager på 13%.

### Diskusjon

I motsetning til tidligere eksperimenter med  $\beta$ -glukaner og et sukkerekstrakt fra den sårhelende planten *Plantago major* L. (groblad) gitt i.p. i den beskrevne infeksjonsmodellen i mus, var AbM ekstrakt A vel så effektivt selv når det ble gitt via mavesonde.  $\beta$ -glukanet med den høyeste effekten etter i.p. administrasjon, hadde ikke effekt når det ble gitt via mavesonde til musene i denne pneumokokk-infeksjonsmodellen. Dette gjør trolig AbM ekstrakt mer nyttig enn  $\beta$ -glukan fordi det ikke krever sterilisering av produktet for intravenøs injeksjon og dermed strenge GMP (good manufacturing practise) krav, samt at produktet kan inntas utenfor sykehus. Vi har tidligere vist at  $\beta$ -glukanene SSG og MacroGard® også forsterker allergiutvikling i en musemodell (Ormstad et al., 2000, Hetland et al., 2000). AbM-ekstrakt A gitt via mavesonde i samme modell viser ingen slik bieffekt. Tvert imot indikerer resultatene med allergimodellen at AbM-ekstraktet beskytter mot allergiutvikling.

Kurvene for bakterieinnhold i blod steg brattere i forsøk 1 enn 2 pga. injeksjon av det doble antall *S. pneumoniae* CFU i det første ( $1.92 \times 10^6$  CFU) i forhold til det andre ( $0.97 \times 10^6$  CFU) eksperimentet. Hensikten var å utfordre dyrene med  $100 \times LD_{50}$  (dødelig dose for 50% av individene) ( $= 100 \times 1.2 \times 10^4$  CFU (Aaberge et al. 1995)) for *S. pneumoniae* serotype 6B. Men fordi antallet CFU som gis er beregnet ut fra antall bakterie CFU som ble nedfrosset etter forrige dyrkning, vil det eksakte antall levende bakterier, dvs. CFU, som injiseres ikke være kjent før dyrkningssvaret av en parallell bakterieprøve foreligger. Det lavere antall bakterier som ble injisert i eksperiment 2 ga også en høyere overlevelsesrate (10-20% etter 7 dager) av kontroll- dyrene i forhold til eksperiment 1 (0% etter 3 dager).

Dette er trolig årsaken til manglende statistisk signifikant forskjell mellom AbM-ekstrakt A og PBS gitt 2 timer før smitte.

Effekten av AbM-ekstrakt A gitt samtidig med smitte, peker  
5 også mot en trolig positiv behandlingseffekt av ekstraktet.  
Det ble ikke gitt i etterkant pga. tidlig høy dødelighet av  
forsøksdyrene i kontrollgruppen i denne infeksjonsmodellen.  
Dette vil bli forsøkt i en annen infeksjonsmodell med  
lavere dødelighet. Siden immunsystemet bruker liknende  
10 mekanismer til å bekjempe kreftceller og virusinfiserte  
celler, nemlig naturlige dreper (NK) celler og cytotoksiske  
T-lymfocytter, og AbM har effekt ovenfor kreft, vil AbM  
trolig også ha positiv effekt ovenfor virusinfeksjoner.

AbM vil trolig kunne brukes som supplement til vaksine hos  
15 utsatte grupper, for eksempel personer som har fått fjernet  
milt og som man vet derfor er mer utsatt for å få pneumo-  
kokk-lungebetennelse og -blodforgiftning. Andre aktuelle  
målgrupper kan være turister som skal reise til land med  
dårlig hygiene eller kirurgiske pasienter hvor det gis  
20 forebyggende antibiotikaprofylakse før operasjon. Man kan  
også tenke seg at mer utstrakt bruk av en "immunstimu-  
lerende" substans som AbM vil kunne dempe antibiotikabruk  
og "overvaksinering" og gi immunsystemet større mulighet  
til å "utdanne seg" til bekjempelse av mikrober, og slik  
25 også ha en dempende effekt på allergiutvikling. I følge  
hygienehypotesen skyldes den økende allergifrekvensen i  
vestlige land atbefolkningen skjermes mer for sykdomsfrem-  
kallende mikrober. Det faktum at AbM er vist å beskytte mot  
kreft i en musemodell og det ikke er kjente bivirkninger av  
30 AbM ekstrakt hos millioner japanske helsekostbrukere, øker  
også nytteverdien av AbM som forebyggende/behandlende  
middel.

## Konklusjon

- Foreliggende resultater viser at et AbM-ekstrakt beskytter mot dødelig pneumokokk-infeksjon i mus når ekstraktet gis via mavesonde. Kun høyrensete ekstrakter ("gold label") har
- 5 signifikant effekt. Positiv effekt ble funnet når ekstraktet ble gitt fra 24 timer før til umiddelbart før bakteriesmitte. Dette ble demonstrert vha. lavere bakterietall i blod og øket overlevelsesrate hos dyr som fikk AbM ekstrakt sammenliknet med dyr som fikk saltvann.
- 10 Det faktum at ekstraktet virker etter inntak via fordøyelsessystemet, gjør AbM svært interessant som et antibakterielt medisinsk middel. AbM-ekstrakt vil kunne forebygge mot og trolig også virke terapeutisk ovenfor infeksjon spesielt med bakterier, men sannsynligvis også andre
- 15 sykdomsfremkallende mikroorganismer. I en tid med økende antibiotikaresistens vil AbM kunne være et naturlig supplement eller alternativ, med færre bivirkninger, til antibiotika og evt. andre anti-infeksjonsmidler, samt ha positiv bieffekt som kreftbeskyttende substans.
- 20 Tabellene og figurene anført nedenfor relaterer seg til de forsøk som er beskrevet tidligere.

### Tabell 1

- Forsøksprotokoll for AbM behandling via mavesonde av NIH/OlaHsd mus infisert med pneumokokker (*Streptococcus pneumoniae*) av serotype 6B.
- 25

A) Eksperiment 1: Behandling med forskjellige AbM ekstrakter 2 timer før smitte

Gruppe	Dag 0, -2t	Dag 0, 0t	Dag 10
AbM A	Ekstrakt A	Pn6B $1.9 \times 10^6$ CFU	Avslutning
AbM B	Ekstrakt B	Pn6B $1.9 \times 10^6$ CFU	Avslutning
AbM C	Ekstrakt C	Pn6B $1.9 \times 10^6$ CFU	Avslutning
AbM D	Ekstrakt D	Pn6B $1.9 \times 10^6$ CFU	Avslutning
AbM E	Ekstrakt E	Pn6B $1.9 \times 10^6$ CFU	Avslutning
PBS	PBS	Pn6B $1.9 \times 10^6$ CFU	Avslutning

B) Eksperiment 2: Behandling med AbM A ekstrakt på forskjellige tidspunkt før smitte

Gruppe	Dag -1	Day 0, -2t	Dag 0, 0t	Dag 0, 0t	Dag 10
AbM -24t	Ekstrakt A			Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
PBS -24t	PBS			Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
AbM -2t		Ekstrakt A		Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
PBS -2t		PBS		Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
AbM 0t			Ekstrakt A	Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
PBS 0t			PBS	Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning

5

Forkortelser: AbM (*Agaricus blazei* Murill), Pn (pneumokokker)

### Figurlegende

**Fig. 1.**

- 10 Antall pneumokokker av serotype 6B CFU i perifert blod fra NIH/Ola Hsd hunnmus forbehandlet med AbM ekstrakt A-E eller PBS via mavesonde (volum 200  $\mu$ l) 2 timer før injeksjon i bukhulen (i.p.) med  $1.92 \times 10^6$  CFU av pneumokokker type 6B



bukhulen (i.p.) med  $1.92 \times 10^6$  CFU av pneumokokker type 6B (se Tabell 1). Dyrene ble blødd ved angitte intervaller, prøvene sådd ut og antall CFU opptalt. Døde dyr er angitt som dyr med  $1 \times 10^9$  CFU i blodet. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser lavere CFU nivåer i AbM ekstrakt A-behandlede dyr.

**Fig. 2.**

Overlevelsesrate (median verdier) for musene i Fig. 1. som ble forbehandlet med AbM ekstrakter eller PBS 2 timer før i.p.-smitte med pneumokokker serotype 6B. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser høyere overlevelse av AbM ekstrakt A-behandlede dyr.

**Fig. 3.**

Antall pneumokokker av serotype 6B CFU i perifert blod fra NIH/Ola Hsd hunnmus forbehandlet med AbM ekstrakt A eller PBS via mavesonde (volum 200  $\mu$ l) 24 eller 2 timer eller umiddelbart før (i.p.) injeksjon med  $0.97 \times 10^6$  CFU av pneumokokker type 6B (se Tabell 1). Dyrene ble blødd ved angitte intervaller, prøvene sådd ut og antall CFU opptalt. Døde dyr er angitt som dyr med  $1 \times 10^9$  CFU i blodet. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser lavere CFU nivåer i AbM ekstrakt A-behandlede dyr. Merk: logaritmisk skala på Y-aksen.

**Fig. 4.**

Overlevelsesrate (median verdier) for musene i Fig. 3. som ble forbehandlet med AbM ekstrakt A eller PBS 24-0 timer før i.p. smitte med pneumokokker serotype 6B. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser høyere overlevelse spesielt av dyr behandlet med AbM ekstrakt A 24 t før smitte.

**Fig. 5.**

Effekt av AbM p.o. på IgE anti-OVA-nivåer i OVA-immuniserte mus.

**Fig. 6.**

- 5 Effekt av AbM p.o. på Ig2a anti-OVA-nivåer i OVA-immuniserte mus.

**Fig. 7.**

- Effekt av AbM på fektal bukhinnebetennelse (peritonitt) hos Balb/c-mus som fikk AbM dag -1 p.o. og 1/8 feces-fortynning i.p. dag 0. Figuren viser overlevelse (Kaplan-Meier-plot).
- 10

**Fig. 8.**

THP-1-celler stimulert med AbM og endotoksin.

**Fig. 9.**

- Figuren viser et "scatter-plot" - F365 Mean - B635 vs F532 Mean - B532 mikromarray av gener som oppreguleres mot gener som nedreguleres under påvirkning av ekstrakt fra *Agaricus blazei murill*.
- 15

- Det er ifølge foreliggende oppfinnelse foretrukket å gi AbM-ekstraktet med den antibakterielle virkning i kombinasjon med minst et ytterligere medikamentelt middel, hvor det videre er foretrukket at det ytterligere medikamentelle middel er et antibakterielt middel.
- 20

- Det er også videre foretrukket å gi det foreliggende AbM-ekstrakt som et oralt middel. I denne sammenheng kan ekstrakter bli gitt som sådan, men det kan også kombineres med vanlige bæremidler og eksipienter slik at det kan bli gitt som et flytende middel så som en eliksir, en mikstur,
- 25

en tinktur etc. Alternativt kan AbM-ekstraktet bli gitt i form av et fast medikament så som en pille, en tablett, en kapsel, en sugetablett etc.. I denne sammenheng kan medikamentet også bli tilsatt vanlige tilsatsstoffer så som smaksstoffer (sukkerer, søtningsstoffer etc.) og fargestoffer.

For ytterligere å underbygge anti-infeksjonseffekten av ekstrakter av AbM ble det etablert at et ekstrakt fra AbM hadde beskyttende effekt også mot bukhinnebetennelse (peritonitt) i Balb/c-mus infisert i.p. med en fecesfortynning. AbM-ekstraktet ble gitt med sonde p.o. 24 timer før inokulasjon i.p. og temperatur (målt ved hjelp av scanning av et temperatur-chip implantert i nakkeskinnet hos musene), bakteriemi i perifert blod og overlevelse ble undersøkt. Det fantes signifikante forskjeller i alle disse parametere i forhold til kontrollmus som var behandlet med fysiologisk saltvann p.o. i stedet for AbM. Fig. 7 viser den positive effekten av AbM på overlevelse av feces-infiserte mus.

Monocyttter i blod og monocytt-deriverte makrofager i vevene er sentrale immunceller i det medfødte immunsystem som aktive komponenter i *Agaricus* påvirker. For å undersøke den stimulerende effekt av *Agaricus* på slike celler ble det benyttet den humane promonocytt-cellelinje THP-1 som ble dyrket i 24 timer ved nærvær eller fravær av 10% sterilfiltrert AbM-ekstrakt. Det ble undersøkt både utskillelse av signalsubstanser (cytokiner) fra cellene til cellekultursupernatanten og opp- eller nedregulering av gener som koder for cytokiner. Utskilte cytokiner ble målt ved hjelp av ELISA-metodikk og viste at *Agaricus*-stimulering av cellene økte utskillelse av sentrale betennelsesøkende (pro-inflammatoriske) cytokiner sin interleukin (IL)-6 og IL-8 (blant annet kjemoattraktanter for henholdsvis T-lymfocytter og nøytrofile granulocytter), mens utskillelsen av et sentralt betennelsesdempende (T-celle-regulatorisk) cytokin som TGF $\beta$ , ble dempet (Fig. 8). Liknende effekt på

IL-6 ble også demonstrert i primære monocytter fra perifert blod (ikke vist). På den annen side var det ingen utskillelse av IL-4 (allergi-fremmende) eller IL-10 (betennelsesdempende/treg) -cytokin fra cellene.

- 5 Viktigst er imidlertid funnene gjort ved hjelp av mikroarray-teknikk hvor mRNA (signalarvestoff for enkeltgener) isolert fra celler som er stimulert eller ikke stimulert med en substans, konkurrerer om binding til en probe på en chip hvor de komplementære nukleotidbasene for mRNA til
- 10 gener man ønsker å undersøke, er påprintet. Der hvor substansen stimulerer ekspresjon av et bestemt gen, vil det dannes flere mRNA-molekyler som utkonkurrerer bindingen til proben av mRNA for dette genet fra ustimulerte celler. mRNA fra stimulerte celler og kontroller er merket med
- 15 henholdsvis rød og grønn fluorescerende farge som nyttes ved avlesning av resultatet av bindingen ved hjelp av et instrument som kvantifiserer lyssignaler med bølgelengdene for det aktuelle røde og grønne lys. Mikroarray av THP-1-celler stimulert med AbM-ekstrakt i 24 timer viste kraftig
- 20 øket oppregulering av gener for pro-inflammatoriske cytokiner som IL-1, IL-8 og TNF $\alpha$ , samt det nyoppdagete gener for styrking av anti-infeksjons- og anti-tumorforsvaret (Th1 cytokin), nemlig IL-23 $\alpha$  subenhet p19 som inngår i (Th1 cytokinfamilien) IL-12-familien. På den
- 25 annen side var ikke genet for IL-4 eller IL-10 oppregulert. Fig. 9 viser et slikt mikroarray etter konkurranse mellom binding av genprodukter fra kontrollceller og celler stimulert med AbM-ekstrakt.

- Resultatene av disse celleforsøkene viser at AbM-ekstrakt
- 30 stimulerer anti-infeksjonsforsvaret (øket Th1-respons) og ikke øker et sentralt allergifremkallende cytokin som IL-4 (gir Th2-respons). Når litteraturen så sier at det er en balanse mellom Th1- og Th2-responsene slik at en økning i den ene følges av en senkning av den andre, tilsier dette
- 35 at en øket Th1-respons gir en senket Th2-respons, slik som det observeres fra resultatet av allergi-musemodellen (se

nedenfor). Det at anti-infeksjonsforsvaret stimuleres av AbM-ekstrakt betyr at kroppens forsvar overfor infeksjoner som sådanne styrkes, det være seg bakterier, virus eller parasitter. Følgelig vil den effekt som er påvist fra AbM-ekstrakt overfor infeksjoner (bakterielle og ikke-bakterielle) og allergier, kombinert med den viten som finnes omkring immunologiske prinsipper, tilsi at AbM-ekstrakt vil ha en generell slik virkning, slik som krevet i de foreliggende patentkrav.

10 **FORSØK TIL UNDERBYGNING AV DEN ANTI-ALLERGISKE EFFEKT AV ABM-EKSTRAKT:**

I forhold til den allergibeskyttende effekt av ekstrakter fra *Agaricus blazei* Murill ble følgende forsøk foretatt:

**Materialer og metoder II**

15 **Mus:** Balb/c hunndyr, 6 uker gamle ved ankomst og hvilt 1 uke i dyrestall.

**Reagenser:** Enzym-fermentert ekstrakt A ("gold labell") av AbM-mycelium fra ACE Co., Ltd., Japan, PBS og OVA.

20 **Blodprøvetaking:** Dyrene ble tomtappet ved endt eksperiment i CO<sub>2</sub>-narkose og serum frosset ned ved -20°C.

**Eksperimentell prosedyre:** Musene (n=8/gruppe) ble sondeforet med 200 µl av AbM-ekstrakt eller PBS på dag -1. Musene ble så immunisert s.c. i haleroten med OVA + Al<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub> (adjuvant) på dag 0 og igjen på dag 20 (forsterkerdose for øket allergirespons). Eksperimentet ble avsluttet etter 26 dager, når IgE anti-OVA-responsen er på topp i denne modellen, etter første OVA-immunisering med hjertepunksjon og tomtapping (for serum) av dyrene under CO<sub>2</sub>-anestesi. Serum fra dyrene ble analysert for IgE, IgG1 og IgG2a anti-OVA og nivå av cytokiner, og tomtappet på dag 30 26.

### Målinger:

Nivå av IgE-, IgG1- og IgG2a-antistoffer i serum mot OVA ble målt med ELISA-teknikk. Nivå av cytokiner (INF $\gamma$ , IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, TGF $\beta$ ) som er typiske for Th1-, Th2- og Th3-responser, ble målt i serum og i supernatant fra dyrkede bukmakrofager og miltceller fra dyrene. Cytokin-målinger ble ikke utført.

Statistikk av resultatene ble utført som forklart ovenfor.

Det ble fra forsøkene funnet et lavere ( $p=0,17$ ) IgE anti-OVA-nivå i serum fra mus som hadde fått AbM per os i forhold til de som hadde fått PBS (Fig. 5). Dette viser at AbM hemmer allergiutviklingen mot OVA på grunn av hemmet Th2-respons. Dessuten viste resultatene en at IgG2a anti-OVA-nivået var høyere i gruppen som hadde fått AbM i forhold til kontroll (PBS-gruppen) (Figur 6). Dette viser at AbM gir en øket Th1-respons, noe som passer med den lavere Th2-responsen som IgE-analysen viste. IgG1 hadde høyere viste motsatte nivåer. Dette ble riktignok ikke støttet av IgG1 anti-OVA-målingene, men denne testen er under utvikling og er enda ikke helt pålitelig, slik at dette funnet ikke regnes som signifikant. I motsetning til dette er det tidligere funnet at  $\beta$ -glukaner så som scleroglykan (Ormestad et al., 2000) og MacroGard® fra gjærsopp (Instanes et al., submittert) (gitt i.p.) forsterker allergiutviklingen i denne aktuelle musemodellen. Dette viser at det eksisterer andre faktorer enn  $\beta$ -glukan i AbM-ekstrakt som er effektive i dyrene, og dette danner en basis for gjenstanden for foreliggende oppfinnelse, idet det ville bli antatt av fagpersonen at substanser som fremmer en gitt immunprosess ikke ville være virksomme i en motsatt immunprosess (se ovenfor angående virkningene av Th1, Th2 og Th3)

Oppfinnelsen angår således i et andre aspekt anvendelse av AbM-ekstrakt til fremstilling av medikamenter som er egnet

til forebygning eller bekjempelse av allergier hos pattedyr, spesielt mennesker. Blant aktuelle allergiske reaksjoner som kan forebygges/bekjempes med sammensetninger omfattende ekstrakt(er) fra AbM ifølge foreliggende oppfin-  
5 nelse, kan det nevnes støvallergi (pollenallergi, høysnue, allergi mot husstøv etc.), matvareallergi (proteinallergier, for eksempel fiskeallergi, melkeallergi, skalldyrsalergi etc.), berøringsallergi (allergi mot dyr så som hunder, katter, etc.).

## Referanser

- Wasser S and Weiss A (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (review). Int J Med Mushrooms, 1, 31-62.
- Ikekawa T (2001). Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on health care. Int J Med Mushrooms, 3, 291-298.
- Chen A (2000). A practical guide to the cultivation of *Agaricus blazei*. The mushroom grower's newsletter IV: 3.
- Huang N-L (1997). Brazilian mushroom (Gee Song Rong). Cultivation of eighth rare and precious gourmet mushrooms. Chinese Agr Press, Huang Ed: 95-101.
- Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H, Hagiwara T, Nakamura T (1989). Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. Carbohydr Res 15, 267-273.
- Iwade I & Muzuno T (1997). Cultivation of Kawariharatake. Food rev Int 13, 383.
- Stamets P (2000). The Himematsutake mushroom of the genus *Agaricus*, *Agaricus blazei* murill. Growing Gourmet and Med Mushrooms, 3<sup>rd</sup> Ed.
- Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T (2001). Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. Biol Pharm Bull 24: 820-8, 2001.
- Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S. (2001) Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro. Cell Struct Funct. 26(2):103-8.



Itoh H, Ito H, Amano H, Noda H. (1994) Inhibitory action of a (1-->6)-beta-D-glucan-protein complex (F III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor  
 5 mechanism. *Jpn J Pharmacol.* 66(2):265-71.

Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kobori H, Moriguchi K, Nakashima H, Matumoto Y, Takahara S, Ebina T, Katakura R.  
 (1998) Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill,  
 10 mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother.* 46(3):147-59.

Ebina T, Fujimiya Y. (1998) Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. *Biotherapy.* 11(4):259-  
 15 65.

Takaku T, Kimura Y, Okuda H (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *J Nutr* 131, 1409-1413.

Menoli RC, Mantovani MS, Ribeiro LR, Speit G, Jordao BQ  
 20 (2001). Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. *Mutat res* 20, 5-13.

Bellini MF, Giacomini NL, Eira AF, Ribeiro LR, Mantovani MS  
 (2003). Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different  
 25 developmental phases of the mushroom. *Toxicol in vitro* 17, 465-469.

Sorimachi K, Ikehara Y, Maezato G, Okubo A, Yamazaki S, Akimoto K, Niwa A (2001) Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on VERO cells in vitro.  
 30 *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 1645-7.

- Henrichsen J. (1979) The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. *J. Infection* 1(suppl. 2), 31-37.
- Aaberge, I.S., Eng, J., Lermark, G. and Løvik, M. (1995) Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a  
 5 standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum. *Microb. Pathogen.* 18, 141-152.
- Riggi, S. and Di Luzio, N.R. (1961) Identification of a RE stimulating agent in zymosan. *Am. J. Physiol.* 200, 297-300.
- 10 Bøggwald, J., Gouda, I., Hoffmann, J., Larm, O., Larsson, R. and Seljelid, R. (1984) Stimulatory effect of immobilized glucans on macrophages in vitro. *Scand. J. Immunol.* 20, 355-360.
- Reynolds, J.A., Kastello, M.D., Harrington, D.G., Crabbs, C.L., Peters, C.J., Jemski, J.V., Scott, G.H. and Di  
 15 Luzio, N.R. (1980) Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. *Infect. Immun.* 30, 51-57.
- Franek J, Malina J, Kratka H. (1992) Bacterial infection  
 20 modulated by glucan: a search for the host defense potentiation mechanisms. *Folia Microbiol (Praha)*. 37(2):146-52.
- Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondo, T., Hattori, T. and Ogawa, N. (1983) Clinical efficacy of lentinan on  
 25 neoplastic diseases. *Adv. Exp. Med. Biol. Biotherapy* 166, 181-187.
- Ohno, N., Kurachi, K. and Yadomae, T. (1987) Antitumor activity of highly branched (1→3) beta-D-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. *J.*  
 30 *Pharmacobiodyn.* 10, 478-486.

Hetland, G., Løvik, M. and Wiker, H.G. (1998) Protective effect of  $\beta$ -glucan against mycobacterium bovis, BCG infection in Balb/c mice. Scand. J. Immunol. 47, 548-553.

5 Hetland G, Ohno N, Aaberge Is, Løvik M. (2000a) Protective effect of  $\beta$ -glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. FEMS Immunol Med Microbiol 27:111-116.

10 Hetland G, Samuelsen AB, Løvik M, Paulsen BS, Aaberge IS, Goeng E-C, Michaelsen TE. (2000b) Protective effect of *Plantago major* L. pectin polysaccharide against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. Scand J Immunol 52: 348-355.

15 Hetland G (2003). Anti-infective action of immuno-modulating polysaccharides ( $\beta$ -glucan and *Plantago major* L. pectin) against intracellular (*Mycobacteria* sp.) and extracellular (*Streptococcus pneumoniae* sp.) respiratory pathogens (Review) Curr Med Chem - Anti-Infec Agens 2, 135-147.

20 Hetland G, Sandven P. (2002)  $\beta$ -1,3-glucan reduces growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage cultures. FEMS Immunol Med Microbiol, 33: 41-45.

25 Ormstad H, Groeng E-C, Løvik M, Hetland G. (2000) The fungal cell wall component  $\beta$ -1,3-glucan has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice. J Toxicol Environ Health, Part A, 61, 55-67.

30 Hetland G, Ormstad H, Ohno N, Løvik M. Fungal  $\beta$ -1,3-glucan SSG from the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* adjuvates the allergic response to ovalbumin in mice. In: Healthy Buildings 2000: Exposure, Human Responses and Building Investigations . Eds.: Seppänen O, Säteri J. Publisher: Gummerus Kirjapaino SIY Indoor Air Information Oy, Finland Vol. 1, pp. 245-250.



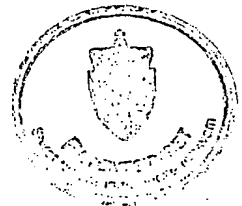
## P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av *Agaricus blazei Murill* (AbM) ved fremstilling av et medikament til bekjempelse eller forebygging av bakterielle og ikke-bakterielle infeksjoner og/eller  
5 allergier i pattedyr.
2. Anvendelse ifølge krav 1 hvor den aktuelle ikke-bakterielle infeksjon er forårsaket av en parasitt eller et virus.
3. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den bakterielle infeksjonen er forårsaket av pneumokokker.  
10
4. Anvendelse ifølge krav 3, hvor pneumokokken er *Pneumococcus pneumoniae*.
5. Anvendelse ifølge krav 1 hvor allergien er en valgt fra gruppen støvallergi (pollenallergi, høysnue, allergi  
15 mot husstøv etc.), matvareallergi (proteinallergier, for eksempel fiskeallergi, melkeallergi, skalldyrsallergi etc.), berøringsallergi (allergi mot dyr så som hunder, katter, etc.).
6. Anvendelse ifølge krav 1 - 5, hvor medikamentet er et  
20 oralt medikament.
7. Anvendelse ifølge krav 1 - 5, hvor medikamentet er et intravenøst preparat.
8. Anvendelse ifølge krav 1 - 7, hvor medikamentet omfatter minst et ytterligere medikamentelt middel.
- 25 9. Anvendelse ifølge krav 8, hvor det ytterligere medikamentelle middel er et antibakterielt middel.
10. Anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvor pattedyret er et menneske.



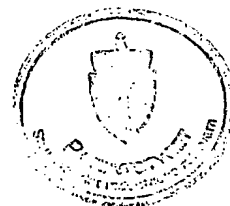
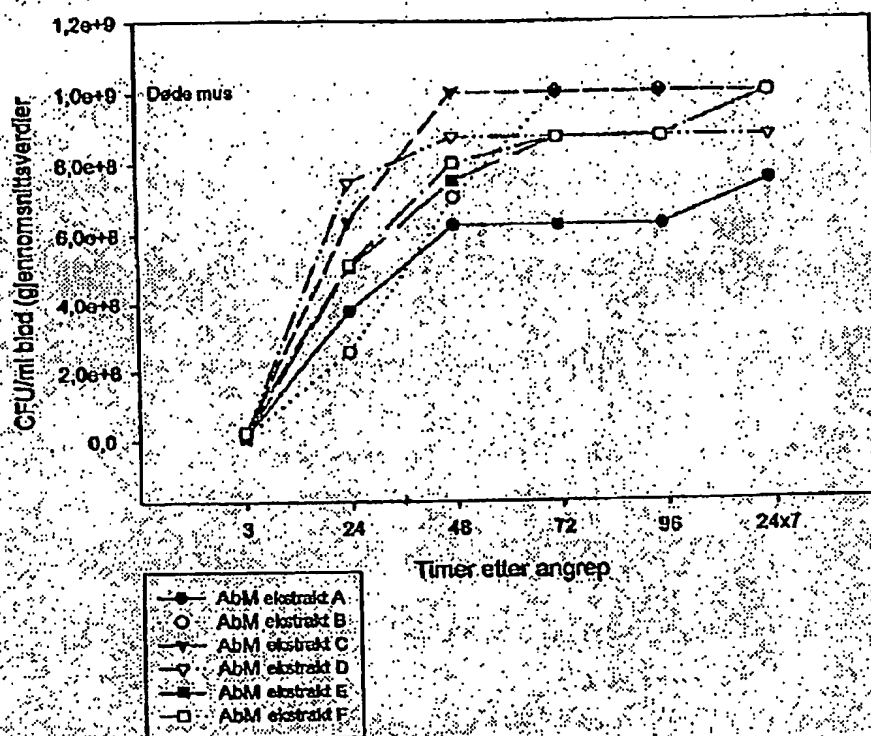
**S a m m e n d r a g**

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av soppen *Agaricus blazei murill* (AbM) ved fremstilling av et medikament til bekjempelse eller forebygning av bakterielle og ikke-bakterielle infeksjoner (for eksempel parasitter eller virus) i pattedyr samt til bekjempelse forebygning av allergi hos pattedyr. Eksempelvis kan en slik infeksjon være forårsaket av pneumokokker og enda mer spesielt hvor pattedyret er et menneske.



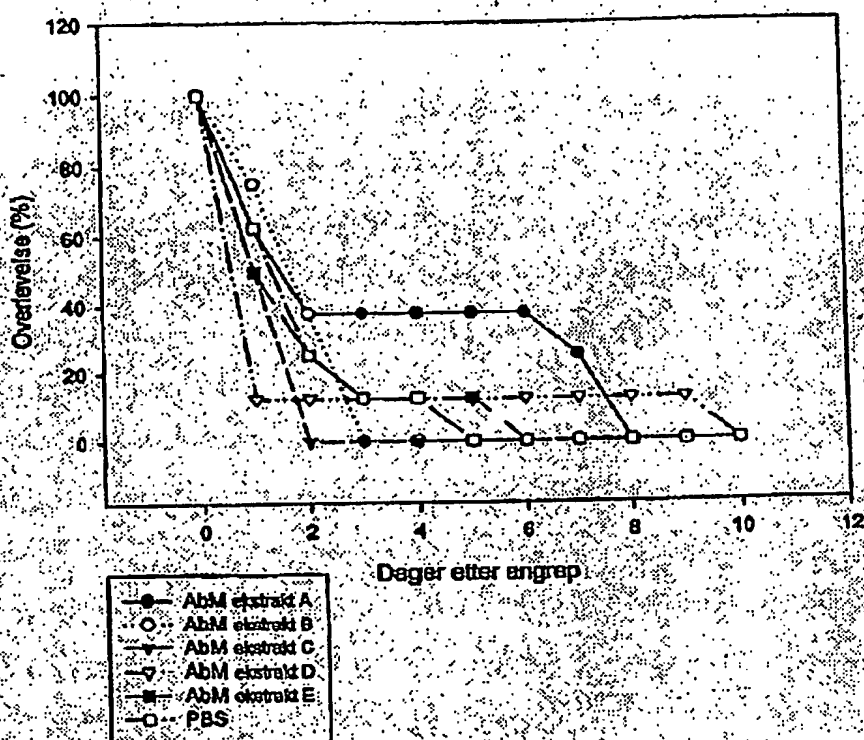
Figur 1.

Bakteriemi i NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 2 timer etter forskjellige AbM-ekstrakter p.o.



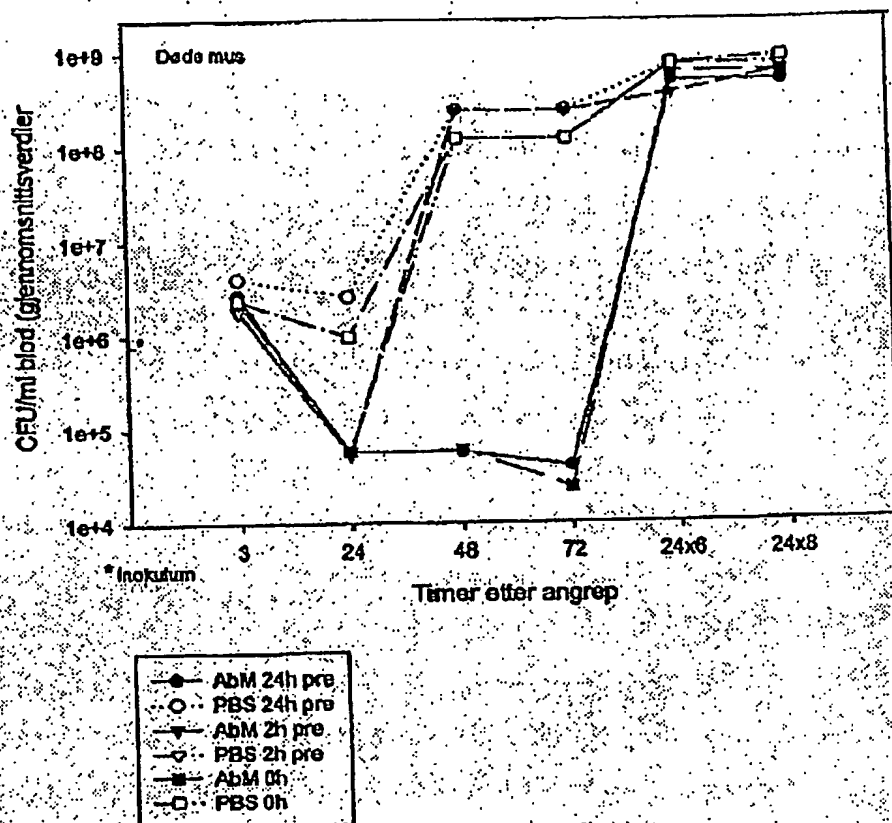
Figur 2.

Overlevelse av NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 2 timer etter forskjellige AbM-ekstrakter p.o.



Figur 3.

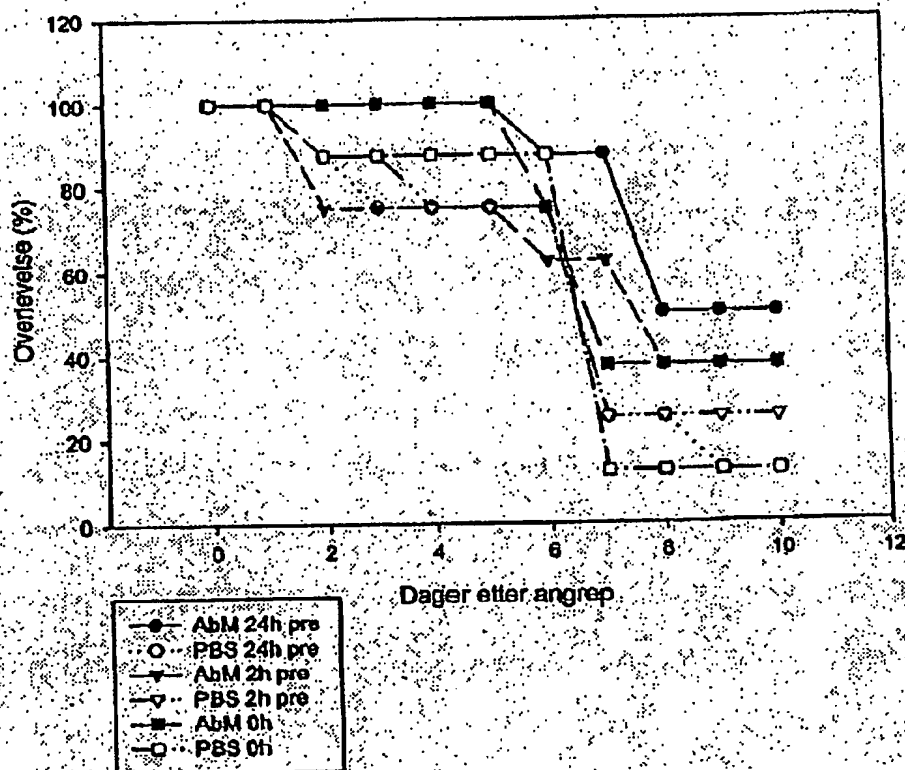
Bakteriemi i NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 24 timer eller 2 timer eller sammen med AbM-ekstrakt A p.o.





Figur 4.

Overlevelse av NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 24 timer eller 2 timer etter, eller sammen med AbM-ekstakt A p.o.



Effect of AbM p.o. on Ig anti-OVA levels in OVA-immunized mice

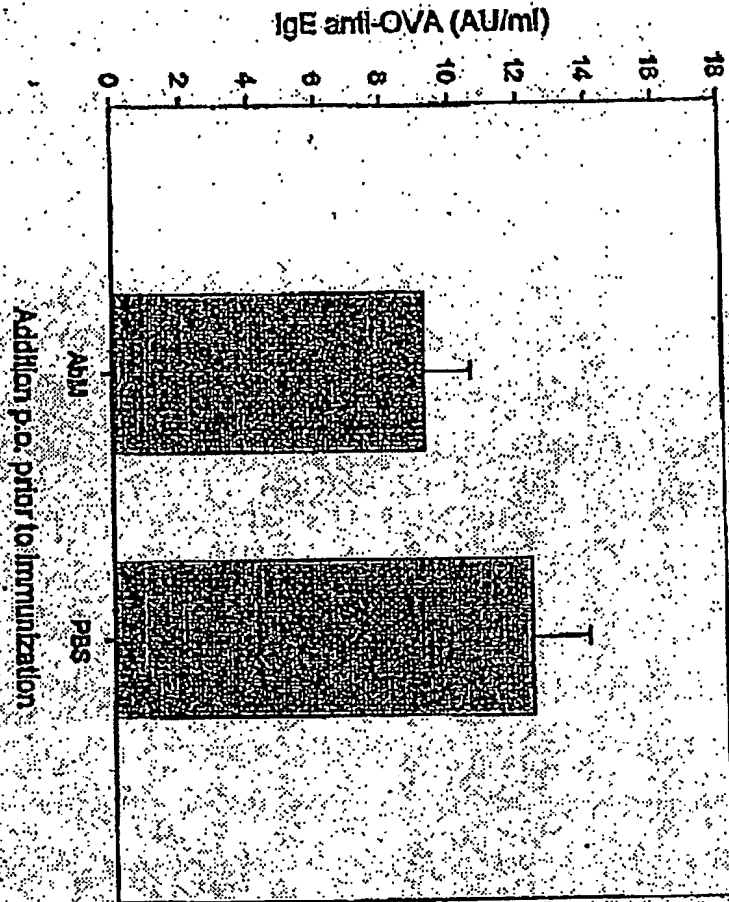
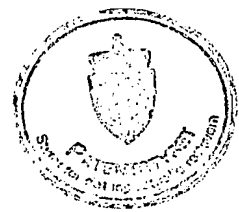


Fig.5



Effect of AbM p.o. on Ig anti-OVA levels in OVA-immunized mice

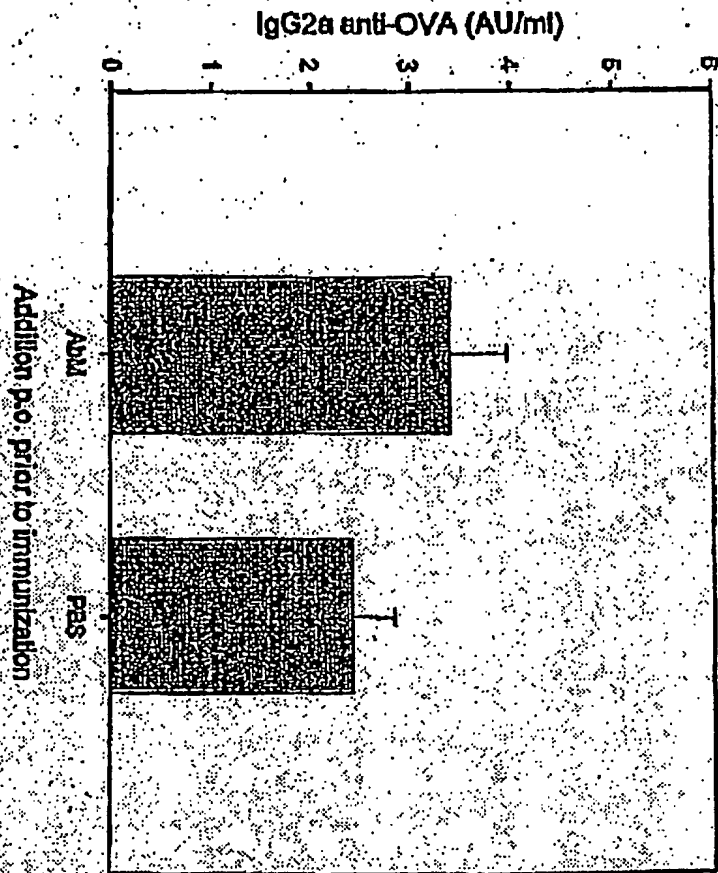


Fig. 6



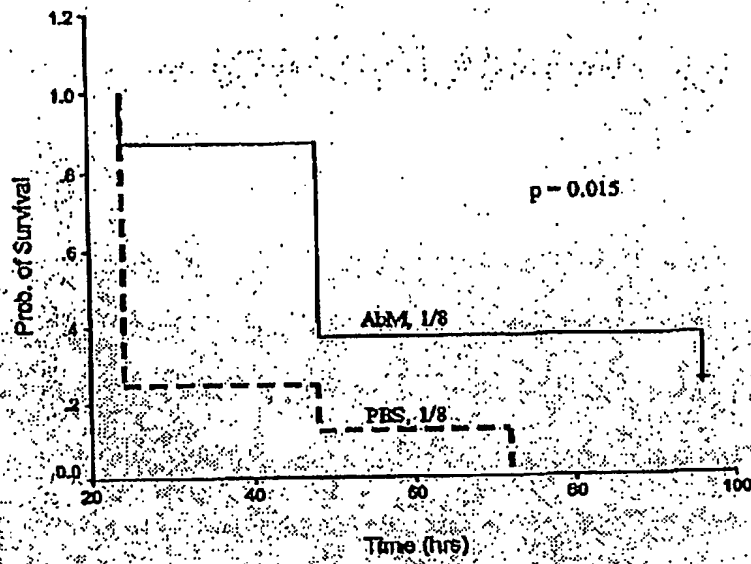


Fig. 7

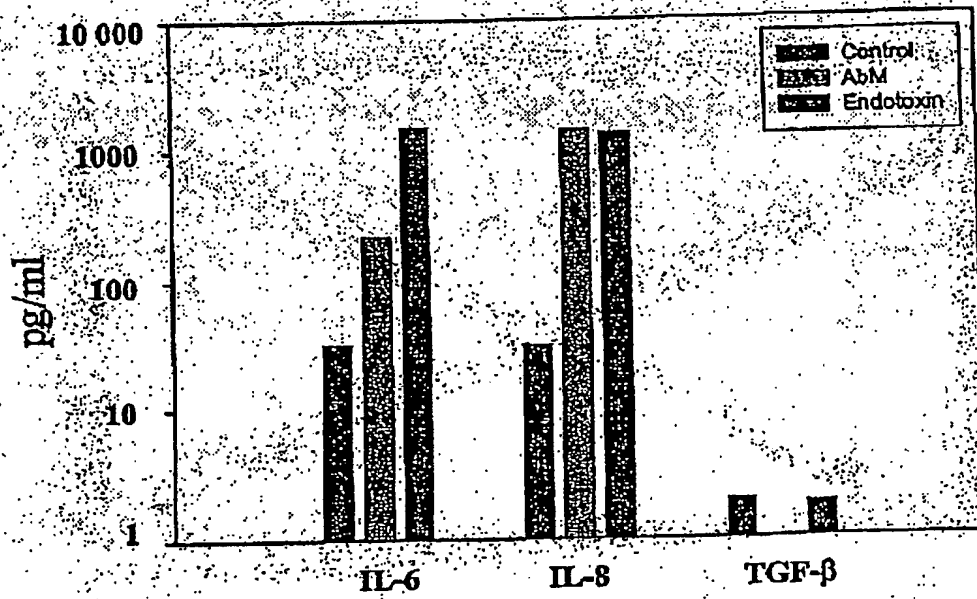


Fig. 8



